

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23935

研究課題名（和文）ヒト多能性幹細胞(Muse細胞)による放射線障害の治療法開発

研究課題名（英文）Development of treatment for radiation injury using Muse cells

研究代表者

藤嶋 洋平 (Fujishima, Yohei)

弘前大学・被ばく医療総合研究所・助教

研究者番号：80846684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：Muse細胞は骨髄幹細胞等の幹細胞には分化できないため、Muse細胞をより未分化にするための基礎的研究を行なった。低酸素・低栄養状態ではMuse細胞のSSEA-3陽性率は低下した。さらに、間葉系幹細胞（MSC）とMuse細胞は互いに互換的に変化する能力を有していることや、MSC中のMuse細胞の割合は一定に保たれている可能性があることを明らかにした。これらのことから、Muse細胞はMSCと別の細胞ではなく、MSCが変化した細胞であり、Muse細胞はMSCと同等かMSCから分化した細胞であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Muse細胞を未分化にするための基礎的研究として、Muse細胞に及ぼす低酸素と低栄養の影響を明らかにすることと、Muse細胞とMSCとの関係を解析することを目的とした。研究の結果、間葉系幹細胞（MSC）とMuse細胞は互いに互換的に変化する能力を有していることや、MSC中のMuse細胞の割合は一定に保たれている可能性があることを明らかにした点で意義がある。今後、MSCをより未分化に変化させることにより、より臨床的に有用な細胞を作ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Since Muse cells could not differentiate into stem cells such as bone marrow stem cells, this research was conducted to make Muse cells more undifferentiated. Under hypoxia and nutrient starvation, the SSEA-3 positive rate of Muse cells decreased. It became clear that mesenchymal stem cells (MSCs) and Muse cells have the ability to change interchangeably with each other, although the proportion of Muse cells in MSCs may remain constant. These results suggest that Muse cells are not different cells from MSCs, but cells with altered MSCs, and Muse cells are cells equivalent to or "differentiated" from MSCs.

研究分野：放射線生物学

キーワード：多能性幹細胞 Muse細胞 放射線障害

1. 研究開始当初の背景

Muse 細胞は、2010 年に東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野の出澤真理教授によって初めて発見・報告された生体内に存在する多能性幹細胞で、組織の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) から FACS を用いて SSEA-3 陽性細胞を分離することが可能である。Muse 細胞は自発的に、外胚葉系、中胚葉系、内胚葉系の細胞に分化することができる。Muse 細胞は iPS 細胞と異なり、腫瘍性に関連する遺伝子が体細胞と同程度に低く、テロメラーゼ活性も低いため、腫瘍形成をしない。また、Muse 細胞は胎児が母体の免疫攻撃を逃れる機構の一つである HLA-G を発現しているため、他家 Muse 細胞は誰にでも生着し、分化することが可能という大きな特徴を持つ。さらに Muse 細胞は、細胞が障害を受けたとき出される警報シグナルの一つであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) に対する受容体の一つである S1P Receptor 2 (S1PR2) を発現しており、静脈投与や局所投与により障害部位への特異的な遊走・生着能を持つ。Muse 細胞は、急性心筋梗塞、脳梗塞、表皮水疱症を対象として探索的臨床試験が開始され、障害された組織の修復に重要であることが臨床的にも強く示唆されている。

癌の放射線治療において、正常組織の急性障害と晩期障害は重要な問題であるが、急性障害の治療としては基本的にステロイドの投与しかなく、放射線治療後の高次脳機能障害、脊髄麻痺、致死性肺線維症などの晩期障害に関しては治療法や予防法はない。さらに、原子力施設の事故等による致死性放射線被ばくに対しては、骨髄移植が重要であるが、事故での被ばくの場合には不均等被ばくであり、近年では事故による致死性放射線被ばくに対する骨髄移植の有効性はほとんど認められていない。

本研究では、Muse 細胞の以下の優れた特性を利用し、放射線障害の治療に用いようとするものである。

- (1) 静脈投与や局所投与により治療が可能である。
- (2) 投与された Muse 細胞は、S1P を発現している障害を受けた細胞に遊走し、S1PR2 を介して生着し、同じ種類の細胞に自発分化する。
- (3) 自発的に外胚葉系、中胚葉系、内胚葉系の細胞に分化することができる。
- (4) 探索的臨床試験が開始されており、有用性が認められれば早期に探索的臨床試験に移行することが可能である。
- (5) 免疫寛容をもたらす HLA-G を発現してホストの免疫系の攻撃を抑制することにより他家移植が可能で、必要である時に患者にすぐに投与が開始できる。

これまでに、*in vitro* における Muse 細胞の分化能としては、メラノサイト、角化細胞、神経細胞、肝細胞、腎細胞、心筋細胞、脂肪細胞、骨細胞への分化が報告されている。動物実験においては、Muse 細胞の静脈投与による組織障害の治療として、心筋梗塞モデル、劇症肝炎モデル、肝部分切除モデル、腎不全モデル、筋変性モデル、大動脈瘤モデルなどの報告があり、障害された組織の修復や機能回復が報告されている。動物実験での Muse 細胞の局所投与による組織障害の治療としては、脳梗塞モデル、脳出血モデル、脊髄損傷モデル、皮膚損傷モデル、糖尿病性皮膚潰瘍モデルが報告されていて、組織修復や機能回復が報告されている。

これまで、Muse 細胞による放射線障害の治療に関する研究は報告されていない。また、iPS 細胞や ES 細胞による放射線障害の治療に関する報告はない。iPS 細胞や ES 細胞による治療に比べると Muse 細胞は、障害が起こった場合にすぐに治療を開始できるという非常に大きなメリットがある。

2. 研究の目的

Muse 細胞は、障害を受けた部位に特異的に遊走・生着し、障害を受けた細胞に置き換わり非常に有用である。しかし、Muse 細胞が造血幹細胞/小腸幹細胞/皮膚幹細胞などの幹細胞に分化する事は報告されていない。正常組織の放射線障害の治療を考えた場合には、生き残った各組織の幹細胞が再増殖するまでの期間、障害を受けた分化した細胞を Muse 細胞で置き換えるためには、Muse 細胞の継続した投与が必要となる。しかし、Muse 細胞を造血幹細胞/小腸幹細胞/皮膚幹細胞などの幹細胞に分化させる事ができれば、より少数の Muse 細胞により正常細胞/組織の放射線障害を効率的に治療する事が可能となる。

本研究では、Muse 細胞を未分化にするための基礎的研究として、Muse 細胞に及ぼす低酸素と低栄養の影響を明らかにすることと、Muse 細胞と MSC との関係を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト Muse 細胞はヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) をロンザ株式会社から購入した。培地はロンザ株式会社の Clonetics™・Poietics™細胞培養用培地を用い、ロンザ株式会社のマニュアルに従って培養を行なった。Muse 細胞の分離は、FACS により SSEA-3 を高発現している細胞を分離することによって行なった。

4. 研究成果

ロンザ株式会社から購入した MSC を用いて、SSEA-3 陽性細胞 (SSEA-3 を高発現している細胞) を分離することを行なった。初代培養から 6 代目の MSC を用いた実験では、図 1 に示すようなゲート (ピンク色のドットを囲む領域) を設定した場合に SSEA-3 陽性細胞 (SSEA-3 の発現量が高い細胞) の比率は 3.02% であった。この比率はこれまでの報告とほぼ一致する値であった。

骨髄の幹細胞や癌幹細胞はニッチと呼ばれる低酸素・低栄養の特別な環境で細胞は生育している。ニッチの環境は幹細胞性の維持に必要な条件と考えられる。このため、低酸素・低栄養状態が Muse 細胞に与える影響を検討した。低酸素・低栄養状態では、Muse 細胞の SSEA-3 陽性率は低下した。

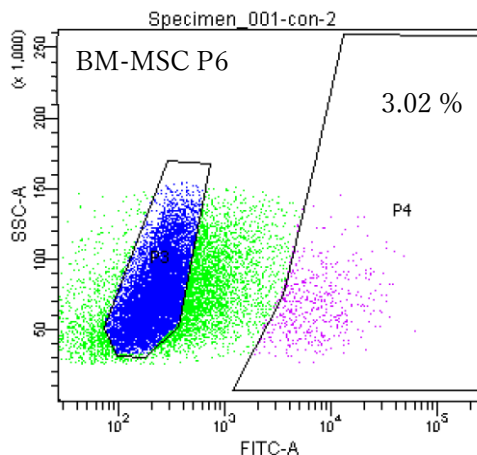


図 1 骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) における SSEA-3 陽性率
継代 6 代目の MSC における SSEA-3 陽性率が図に示すゲートの設定 (ピンク色のドット部分) で 3.02% であることを示す。横軸は 1 次抗体 SSEA-3、2 次抗体 Alexa488 (GFP 波長) のシグナルを示し、縦軸は SSC (side scatter: 側方散乱光) を示す。

次に継代 6 代目の MSC (BMMSC P6) から分離した Muse 細胞 (SSEA-3 陽性細胞) を同一の培地で継代を続けた場合に、SSEA-3 陽性という Muse 細胞の性質が維持されるかどうかを検討した。BMMSC P6 から分離した SSEA-3 陽性細胞を 11 代まで継代した細胞 (SSEA(+)-P11) を用いて、FACS により SSEA-3 の陽性率を検討した、図 2 に示す通り、11 代まで継代することにより SSEA-3 陽性率は 100% から 11.9% に低下した。

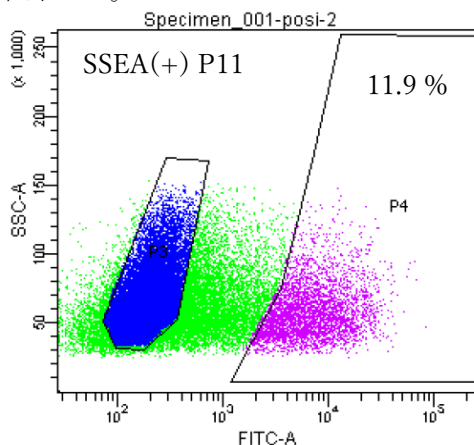


図 2 継代 6 代目の MSC から分離した SSEA-3 陽性細胞を 11 代まで継代した後の SSEA-3 陽性細胞の比率
継代 6 代目の MSC から SSEA-3 陽性細胞を分離し、それを 11 代まで継代し、その細胞の SSEA-3 陽性率を示す。SSEA-3 陽性細胞を分離した時点では陽性率は 100% であったはずであるが、11 代では図に示すように 11.9% に低下していた。横軸は 1 次抗体 SSEA-3、2 次抗体 Alexa488 (GFP 波長) のシグナルを示し、縦軸は、SSC (side scatter: 側方散乱光) を示す。

次に BMMSC P6 から、図 1 に示すようなゲート (青色ドットを囲む領域) を設定して SSEA-3 陰性細胞 (SSEA-3 の発現量が高い細胞) を分離した。その細胞を同一の培地で継代を続けた場合に、SSEA-3 陰性という性質が維持させるかどうかを検討した。BMMSC P6 から分離した SSEA-3 陰性細胞を 11 代まで継代した細胞 (SSEA(-)-P11) を用いて、FACS により SSEA-3 の陽性率を検討

した、図 3 に示す通り、11 代まで継代することにより SSEA-3 陽性率は 0% から 3.9% に増加した。この陽性率は、BMMSC P6 の SSEA-3 陽性率にほぼ等しい値であった。

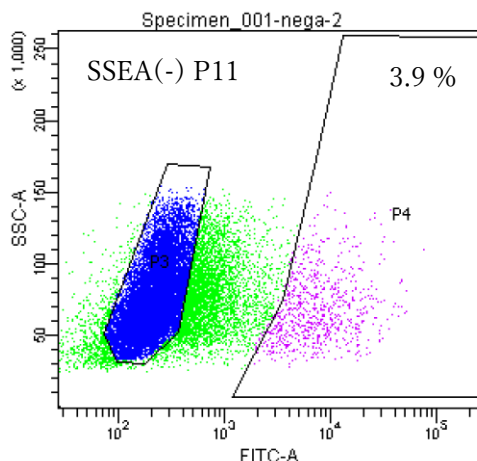


図 3 継代 6 代目の MSC から分離した SSEA-3 陰性細胞を 11 代まで継代した後の SSEA-3 陽性細胞の比率。

継代 6 代目の MSC から SSEA-3 陰性細胞を図に示すゲートの設定 (青色のドット部分) 分離し、それを 11 代まで継代し、その細胞の SSEA-3 陽性率を示す。SSEA-3 陰性細胞を分離した時点では陽性率は 0% であったはずであるが、11 代では図に示すように 3.9% に増加していた。横軸は 1 次抗体 SSEA-3、2 次抗体 Alexa488 (GFP 波長) のシグナルを示し、縦軸は、SSC (side scatter : 側方散乱光) を示す。

BMMSC P6、SSEA(-)P11、SSEA(+P11 の 3 種類の細胞の SSEA-3 の発現の状態を図 4 に示す。BMMSC P6 と SSEA(-)P11 は、SSEA-3 の発現に関してほぼ同様な分布を示すことが明らかとなった。BMMSC P6 と SSEA(+P11 を比較すると SSEA-3 の高発現の領域において違いがあり、その違いは図 1 で用いた SSEA-3 陽性細胞の分離に利用したゲートより広い範囲に及んでいることが明らかになった。このため、SSEA-3 陽性細胞を分離するために、図 4 の情報を元にしてより広い範囲にゲートを設定して SSEA-3 陽性率を決定し、陽性率を比較した。図 5 に示す通り、より広い範囲にゲートを設定することにより SSEA-3 陽性率は高まるが、BMMDC P6 と SSEA(-)P11 の SSEA-3 陽性率に大きな違いがない点と SSEA(+P11 細胞の陽性率が 100% から大きく減少している点には違いが認められなかった。

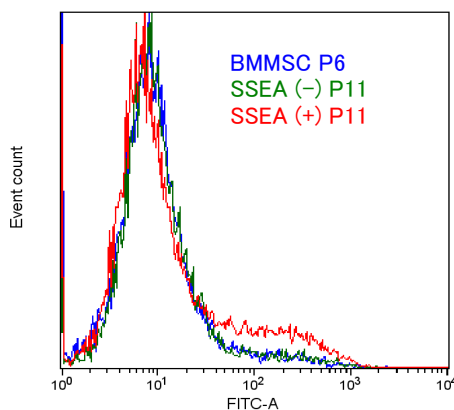


図 4 SSEA-3 陽性率の分布

継代 6 代目の MSC と、それから分離した SSEA-3 陽性細胞と陰性細胞を 11 代まで継代した後の SSEA-3 陽性細胞の比率を示している。SSEA-3 陰性細胞を分離して 11 代まで培養すると、SSEA-3 の分布は継代 6 代目の分布と違いはなくなった。SSEA-3 陽性細胞を分離して 11 代まで培養すると、SSEA-3 の分布は継代 6 代目の分布と同様になるが、SSEA-3 を強発現している部分が多くなっている。横軸は 1 次抗体 SSEA-3、2 次抗体 Alexa488 (GFP 波長) のシグナルを示し、縦軸は頻度を示す。BMMSC : 骨髄由来 MSC (6 代目)、SSEA(-) : 6 代目の MSC から分離した SSEA-3 陰性細胞を 11 代まで継代した細胞、SSEA(+P11 : 6 代目の MSC から分離した SSEA-3 陽性細胞を 11 代まで継代した細胞

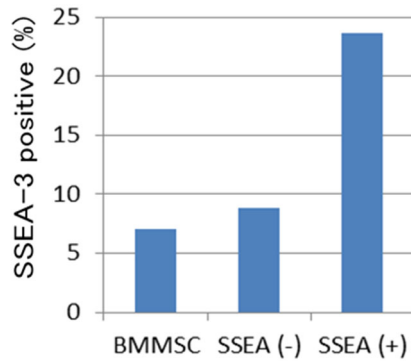


図5 BMMSC、SSEA(-)P11、SSEA(+)P11のSSEA-3陽性細胞の比率。

図1-3ではSSEA-3陽性細胞として、図に示すゲートの設定（ピンク色のドット部分）を分離した。しかし図4で示す結果から、よりSSEA-3陽性細胞のゲートの範囲としてより低発現の部分からゲートを設定すべきことが示唆された。このため、図4を参考としてゲートをより広めに設定してゲートを設定し、図1~3と同様な検討を行なった。その結果、図1~3に示す結果と同様に、SSEA-3陰性細胞のみを分離したSSEA(-)P11は5代継代することによりSSEA-3陽性細胞の比率は0%から増加してBMMSCとほぼ同等になり、SSEA-3陽性細胞のみを分離したSSEA(+)P11は5代継代することによりSSEA-3陽性細胞の比率は約24%まで低下した。SSEA(-) : SSEA(-)P11を示す。SSEA(+) : SSEA(+)P11を示す。

これらの実験結果から、以下の点が明らかになった。

- (1) MSCとMuse細胞は互いに互換的に変化する能力を有している。
- (2) MSC中のMuse細胞の割合は一定に保たれている可能性がある。

これらのことから、Muse細胞はMSCと別の細胞ではなく、MSCが変化した細胞であり、Muse細胞はMSCと同等かMSCから“分化した”細胞であることが示唆された。Muse細胞をより未分化にすることは難しいことが示唆されたため、今後はMSCをより未分化に変化させることにより、より臨床的に有用な細胞を作ることを目指すこととした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiga Soichiro, Murata Yasuhiko, Hashimoto Takuma, Urushihara Yusuke, Fujishima Yohei, Kudo Kanna, Sonohara Yaoki, Kurusu Miku, Takeda Kazuya, Jingu Keiichi, Hosoi Yoshio	4. 巻 521
2. 論文標題 DNA-PKcs is activated under nutrient starvation and activates Akt, MST1, FoxO3a, and NDR1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 668 ~ 673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本拓磨, 園原八起, 漆原佑介, 藤嶋洋平, 細井義夫
2. 発表標題 重度な低酸素状態のヒト神経膠芽腫株T98GにおけるAMPK を介したHIF-1 の発現制御の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 漆原佑介, 橋本拓磨, 藤嶋洋平, 細井義夫
2. 発表標題 栄養飢餓状態の乳がん細胞株MDA-MB-231におけるAMPKの転写因子を介したDNA損傷応答制御
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本拓磨, 漆原佑介, 村田泰彦, 藤嶋洋平, 武田一也, 志賀壮一郎, 工藤香菜, 園原八起, 細井義夫
2. 発表標題 低酸素状態のグリオーマ芽腫T98GにおいてAMPKは転写因子を介してATMの発現および放射線抵抗性を制御する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 漆原佑介, 橋本拓磨, 村田泰彦, 藤嶋洋平, 武田一也, 志賀壮一郎, 工藤香菜, 園原八起, 細井義夫
2. 発表標題 乳がん細胞株MDA-MB-231の栄養飢餓状態におけるAMPK を介したATM、DNA-PKcs、Src 経路の活性化
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本拓磨, 村田泰彦, 漆原佑介, 藤嶋洋平, 武田一也, 志賀壮一郎, 工藤香奈, 園原八起, 細井義夫
2. 発表標題 低酸素状態がATMとDNA-PKcsの発現と活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会・第48回放射線による制癌シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関